

บทความพิเศษ

Current Concepts on Cell Based Model of Coagulation and Roles of Factor VIIa and Tissue Factor on Hemostasis, Thrombosis, and Pathogenesis of Other Related Diseases

นภาพงษ์ เอื้อประเสริฐ

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการแข็งตัวของเลือด (Coagulation) เป็นกลไกที่ซับซ้อน ประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของทั้งกลไกปฐมภูมิ (Primary hemostasis) ซึ่งมีเกร็ดเลือด (Platelet) และเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cell) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ และกลไกทุติยภูมิ (Secondary hemostasis) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (Coagulating factor) หลายชนิดทำงานต่อเนื่องกัน โดยมีการทำงานของระบบสลายลิ่มเลือด (Fibrinolytic system) และสารต้านการแข็งตัวของเลือดตามธรรมชาติ (Natural anticoagulant) อีกหลายชนิดควบคุมการเกิดลิ่มเลือดให้อยู่ในสมดุล ปัจจุบันความเข้าใจในกลไกการแข็งตัวของเลือดได้เปลี่ยนแปลงจากอดีตอย่างมากทำให้เกิดความเข้าใจในพยาธิกำเนิดและการคิดค้นการรักษาใหม่ๆ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบบทบาทสำคัญของกลไกการแข็งตัวของเลือดโดยเฉพาะบทบาทของ tissue factor ต่อพยาธิกำเนิดของโรคต่างๆ ซึ่งจะนำไปสู่ความก้าวหน้าในการดูแลรักษาผู้ป่วยในอนาคต บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทบทวนความรู้ใหม่ของกลไกการแข็งตัวของเลือดบนผิวเซลล์ และบทบาทสำคัญในประเด็นต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

กลไกการแข็งตัวของเลือดบนผิวเซลล์ (Cell based model of coagulation)

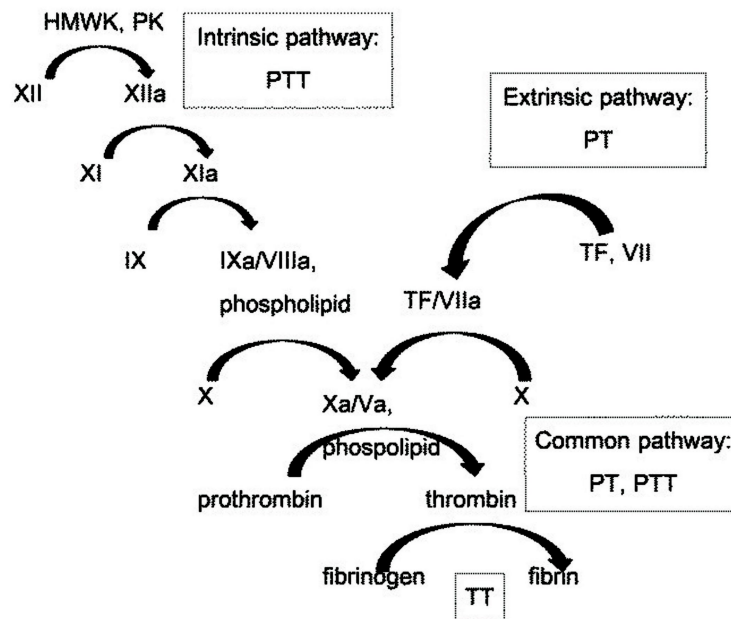
ในอดีตเชื่อว่ากลไกการแข็งตัวของเลือดประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดประกอบเป็น extrinsic pathway และ intrinsic pathway ทำงานแยกจากกันในการกระตุ้นโปรตีนที่อยู่ใน common pathway และมีการกระตุ้นต่อเนื่องเป็นลำดับขั้นคล้ายการไหลของน้ำตก¹ (Waterfall hypothesis) เพื่อสร้าง thrombin

เปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกร็ดเลือด (Platelet aggregation) เป็นลิ่มเลือดที่แข็งแรง ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งมีความสอดคล้องกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการทาง coagulogram อย่างไรก็ตามมีการศึกษาต่อมาที่แสดงให้เห็นถึงข้อบกพร่องและนำไปสู่แนวคิดใหม่ของกลไกการแข็งตัวของเลือด ซึ่งพบว่าไม่ได้มีการแบ่งแยกเป็น extrinsic pathway และ intrinsic pathway ที่ชัดเจน โดยที่ contact factor ใน intrinsic pathway ได้แก่ factor XII, prekallikrein (PK) และ high molecular weight kininogen (HMWK) ไม่ได้มีบทบาทในการแข็งตัวของเลือดในร่างกายโดยพบว่าผู้ป่วยที่ขาด factor เหล่านี้แต่กำเนิดมี PTT ยาวโดยที่ไม่มีเลือดออกผิดปกติ และกระบวนการส่วนใหญ่เกิดบนพื้นผิวของเซลล์² (Cell based model) โดยเฉพาะเซลล์ที่แสดง tissue factor (TF) บนผิวเซลล์ (Tissue factor bearing cell) และเกร็ดเลือดดังแสดงในรูปที่ 2

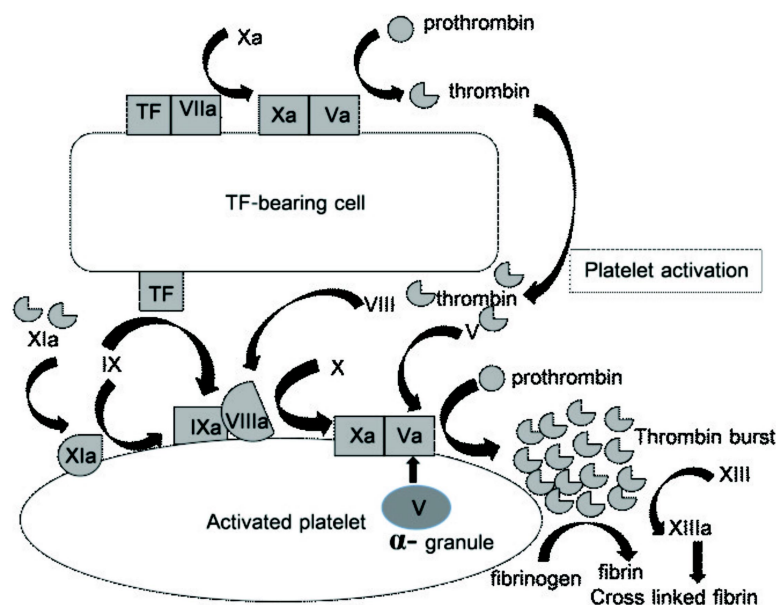
เมื่อเกิดการทำลายของผนังหลอดเลือดทำให้ factor VIIa (FVIIa) ซึ่งมีปริมาณต่ำในพลาสมา สัมผัสกับ TF บนผิวเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์บุผนังหลอดเลือดเช่น vascular smooth muscle cell, pericyte, และ adventitious fibroblast เป็นต้น^{3,4} เกิดเป็น TF:FVIIa complex ซึ่งจะเปลี่ยน FVII เป็น FVIIa มาจับกับ TF เป็น TF:FVIIa complex มากขึ้น และยังพบว่า TF ที่อยู่รอบหลอดเลือดบริเวณผิวหนึ่งสามารถจับกับ FVII หรือ FVIIa ในภาวะที่ไม่มีการทำลายของหลอดเลือด⁵ นอกจากนี้ TF ยังอาจมาจากในกระแสเลือด (Blood borne tissue factor) ในรูป encrypted TF ซึ่งเป็น TF ที่ไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว บนผิว microparticle ซึ่งเป็นอนุภาคขนาดเล็กที่ส่วนใหญ่หลุดออกมาจากผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นโดยมีส่วนประกอบของ anionic phospholipid ที่ช่วยส่งเสริมการแข็งตัวของเลือด และบนผิวเกร็ดเลือด⁶ โดย TF จะถูกเปลี่ยนให้มีความสามารถกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด (Tis-

ได้รับต้นฉบับ 24 ตุลาคม 2551 ให้ลงตีพิมพ์ 23 พฤศจิกายน 2551

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ : นพ. นภาพงษ์ เอื้อประเสริฐ สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 E-mail : dnooppacharn@yahoo.com



รูปที่ 1 แสดงกลไกการแข็งตัวของเลือดแบบ waterfall hypothesis แบ่งการทำงานของกลไกการแข็งตัวของเลือดเป็น extrinsic pathway คือ TF:FVIIa complex กระตุ้น FX เป็น FXa และ intrinsic pathway เริ่มจาก contact factor ได้แก่ FXII ถูกเปลี่ยนเป็น FXIIa โดย HMWK และ PK และเปลี่ยน FXI เป็น FXIa ซึ่งจะเปลี่ยน FIX เป็น FIXa โดย FIXa ร่วมกับ FVIIIa เปลี่ยน FX เป็น FXa ซึ่งจะร่วมกับ FVa เปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin และ thrombin เปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin โดย extrinsic pathway และ intrinsic pathway ทำงานแยกจากกันโดยเด็ดขาด



รูปที่ 2 แสดงกลไกการแข็งตัวของเลือดบนผิวเซลล์ (Cell based model of coagulation) TF บนผิวเซลล์จับ FVIIa เป็น TF:FVIIa complex เปลี่ยน FX เป็น FXa และ FIX เป็น FIXa โดย FXa ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยน FV บนผิวเซลล์เป็น FVa และรวมกันเป็น prothrombinase complex เปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin ซึ่งมีปริมาณไม่มาก thrombin จะไปกระตุ้นเกร็ดเลือดให้ทำงาน โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เพิ่ม anionic phospholipid และหลั่ง FV จาก α -granule และ thrombin จะเปลี่ยน FV และ FVIII เป็น FVa และ FVIIIa มากขึ้น โดย FVIIIa ร่วมกับ FIXa เป็น tenase complex เปลี่ยน FX เป็น FXa มากขึ้น ร่วมกับ FVa เป็น prothrombinase complex ซึ่งจะเปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin ในปริมาณมากกว่าช่วงแรกมากเรียกว่า thrombin burst โดย thrombin จะเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ซึ่งจะถูก FXIIIa ทำให้เกิด cross linked fibrin และ thrombin ยังเปลี่ยน FXI เป็น FXIa เพื่อเปลี่ยน FIX เป็น FIXa หลังจาก TF:TFVIIa ถูกยับยั้ง

sue factor decryption) เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ cytosolic Ca^{2+} ทำให้เกิดการเพิ่ม phosphatidylserine และเปลี่ยนตำแหน่งของ TF บนผิวเซลล์⁷ โดย TF: FVIIa complex ที่เกิดขึ้นนอกจากสามารถไปกระตุ้นเปลี่ยน factor X (FX) เป็น factor Xa (FXa) แล้วยังไปเปลี่ยน factor IX (FIX) เป็น factor IXa (FIXa) ได้โดยตรง^{9,9} โดย FXa ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้จะมียีนปริมาณน้อยซึ่งจะไปรวมกับ partially activated factor V (FV) ที่มีปริมาณน้อยบนผิว tissue factor bearing cell เปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin¹⁰ โดย thrombin ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อยในช่วงแรกนี้มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเกร็ดเลือด (Platelet activation) ให้มีการเปลี่ยนรูปร่าง การหลั่ง partially activated FV จาก α -granule ให้มาอยู่บนผิวเกร็ดเลือดมากขึ้น และการเพิ่มปริมาณ anionic phospholipid โดยเฉพาะ phosphatidylserine บนผิวเกร็ดเลือดซึ่งทำหน้าที่เป็นพื้นผิวประจุลบให้โปรตีนในเกลไกการแข็งตัวของเลือดมาจับโดยอาศัย Ca^{2+} เป็นตัวช่วย นอกจากนี้ thrombin ที่เกิดขึ้นจะย้อนกลับไปกระตุ้นการเปลี่ยน partially activated FV เป็น fully active FV บนผิวเกร็ดเลือดมากขึ้น^{11,12} และไปตัด factor VIII (FVIII) ให้หลุดออกจาก von Willebrand factor (vWF) มากขึ้น และเปลี่ยนเป็น factor VIIIa (FVIIIa) บนผิวเกร็ดเลือด¹¹ ผลของกระบวนการนี้ทำให้ FVIIIa รวมกับ FIXa เป็น tenase complex เปลี่ยน FX เป็น FXa จำนวนมาก^{13,14} และ FXa ที่เกิดขึ้นจะไปรวมกับ FVa บนผิวเกร็ดเลือดเป็น prothrombinase complex เปลี่ยน prothrombin เป็น thrombin ในปริมาณมาก และย้อนกลับไปกระตุ้นให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วกว่าเดิมอย่างมากเรียกว่า thrombin burst

เนื่องจาก TF:FVIIa complex จะถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วโดย tissue factor pathway inhibitor (TFPI) โดย TFPI จะรวมกับ FXa เป็น TFPI:FXa complex และไปยับยั้งการทำงานโดยจับกับ TF:FVIIa complex เป็น quaternary structure ทำให้เกิด TF internalization และ FVIIa degradation^{15,16} นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะที่ไม่มี TFPI นั้น endothelial protein C rector (EPCR) ยังสามารถจับกับ FVIIa ทำให้เพิ่ม FVIIa degradation ได้¹⁷ ดังนั้นการสร้าง FIXa ในช่วงหลังจะเกิดจากการที่ thrombin สามารถไปเปลี่ยน factor XI (FXI) เป็น factor XIa (FXIa) โดยไม่ต้องอาศัย FXII¹⁸ ซึ่ง FXIa จะเปลี่ยน FIX เป็น FIXa บนผิวเกร็ดเลือดได้โดยตรง ทำให้เกิด tenase complex บนผิวเกร็ดเลือดได้มากขึ้น ผลรวมของปฏิกิริยาอันซับซ้อนนี้ทำให้มี thrombin ในปริมาณที่มากพอในการเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin เกาะกันอย่างหลวมๆ ทำหน้าที่เชื่อมเกร็ดเลือด

เข้าด้วยกันเกิดเป็นลิ่มเลือดขึ้น นอกจากนี้ thrombin ยังสามารถเปลี่ยน factor XIII (FXIII) เป็น factor XIIIa (FXIIIa) ทำให้เกิดการ cross-link ของ fibrin ทำให้เกิดลิ่มเลือดที่แข็งแรง (Stable clot)¹⁹ นอกจากการกระตุ้นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในเกลไกการแข็งตัวของเลือดโดยตรงแล้ว thrombin ยังกระตุ้น thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)²⁰ ซึ่งยับยั้งกระบวนการสลายลิ่มเลือด (Fibrinolysis) ทำให้ลิ่มเลือดสลายช้าลง

กลไกการแข็งตัวของเลือดบนผิวเซลล์นำไปสู่ความสนใจของการศึกษา extrinsic pathway ได้แก่ FVII และ TF มากขึ้น และนำไปสู่การพัฒนา recombinant FVIIa ในการนำมารักษาผู้ป่วย hemophilia A และ B ที่มี inhibitor ต่อ FVIII และ FIX ตามลำดับ รวมทั้งการนำมาใช้เป็น universal hemostatic agent ในผู้ป่วยอื่นๆ ที่มีภาวะเลือดออกรุนแรง และการศึกษาเกี่ยวกับ TF ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของภาวะต่างๆ มากมาย

Roles of cell based model on hemostatic disorders

ความแตกต่างของลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วย hemophilia A, hemophilia B และ factor XI deficiency ซึ่งขาด FVIII, FIX และ FXI ตามลำดับ ไม่สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการแข็งตัวของเลือดแบบเดิม แต่สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการแข็งตัวของเลือดแบบใหม่บนผิวเซลล์ คือ ผู้ป่วย hemophilia A และ B สามารถเกิดเลือดออกเอง (Spontaneous bleeding) ได้รุนแรงเนื่องจากการขาด FVIII และ FIX ทำให้ไม่สามารถสร้าง tenase complex บนผิวเกร็ดเลือดได้ ดังนั้นจึงไม่เกิด thrombin burst ในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง และการสร้าง fibrin ในปริมาณที่เพียงพอทำให้ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นไม่แข็งแรง²¹ ในขณะที่ผู้ป่วย factor XI deficiency สามารถสร้าง tenase complex บนผิวเกร็ดเลือดได้จากการกระตุ้นผ่าน TF:FVIIa complex โดยตรง ทำให้สามารถสร้าง thrombin ได้ในปริมาณที่มากกว่าจึงเกิดลิ่มเลือดที่มีความแข็งแรงมากกว่าผู้ป่วย hemophilia A และ B อย่างไรก็ตามการขาด FXI ทำให้ขาดกลไกเปลี่ยน FIX เป็น FIXa หลังจาก TF:FVIIa complex ถูกยับยั้งการทำงานโดย TFPI ไปแล้ว ส่งผลให้ลิ่มเลือดมีความแข็งแรงน้อยกว่าปกติและถูกย่อยสลายโดยกระบวนการ fibrinolysis ได้ง่ายขึ้น ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้น TAFI ลดลง ดังนั้นผู้ป่วย factor XI deficiency มักมีเลือดออกภายหลังการผ่าตัดหรือได้รับบาดเจ็บโดยเฉพาะอวัยวะที่มี fibrinolytic activity สูงเช่น ช่องปาก โปรงจมูก ทางเดินอาหาร และทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น แต่มักไม่มีปัญหาเลือดออกเองที่รุนแรงเหมือน

ในผู้ป่วย hemophilia A และ B อย่างไรก็ตามผู้ป่วย factor XI deficiency มีความหลากหลายของลักษณะทางคลินิก และความผิดปกติของ PTT ที่ต่างกันมาก²² ซึ่งอาจอธิบายได้จากกลไกการแข็งตัวของเลือดของแต่ละคนอาศัยการทำงานของ FXI ในการสร้าง thrombin ต่างกัน โดยมีการศึกษาว่าการสร้าง thrombin เมื่อควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมือนกันโดยไม่มี FXI แต่มีปัจจัยอื่นๆ ครบ และใช้เกร็ดเลือดของคนต่างกันพบว่า เกร็ดเลือดของแต่ละคนมีความสามารถส่งเสริมการสร้าง thrombin ต่างกันมาก และเมื่อเติม FXI ลงไปพบว่าการเปลี่ยนแปลงของการสร้าง thrombin ของเกร็ดเลือดแต่ละคนก็ต่างกันมากเช่นกัน ซึ่งอาจอธิบายความแตกต่างทางคลินิกของผู้ป่วย factor XI deficiency ได้¹⁸

นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ขาด factor VII ตั้งแต่กำเนิด สามารถมีเลือดออกเองในเยื่อต่างๆ รวมทั้งในกล้ามเนื้อ และในข้อ คล้ายผู้ป่วย hemophilia A และ B²³ ในขณะที่ไม่พบผู้ป่วยที่เป็น tissue factor deficiency ซึ่งอาจอธิบายได้จากการศึกษาในหนูที่พบว่า หนูที่ขาด TF (TF^{-/-}) จะตายตั้งแต่ระยะเอมบริโอ จากภาวะเลือดออกทั้งในปอด หัวใจ และรก²⁴ นอกจากนี้ยังพบว่ามี ความผิดปกติของระบบหลอดเลือดบน yolk sac²⁵ ทำให้เชื่อว่า TF ยังมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของหลอดเลือด (Vasculogenesis) ด้วย ซึ่งแตกต่างจากหนูที่ขาด FVII (FVII^{-/-}) มีการพัฒนาของระบบหลอดเลือดปกติสามารถมีชีวิตรอดเกิดมาได้ แต่จะมีเลือดออกรุนแรงหลังคลอด ซึ่งบ่งชี้ว่า TF มีความสำคัญในการพัฒนาของหลอดเลือดโดยไม่ต้องอาศัย FVII²⁶

Roles of recombinant factor VIIa (rFVIIa) in hemostasis

การค้นพบ rFVIIa ทำให้เกิดการพัฒนาคูแลรักษาก่อนผู้ป่วยที่มีปัญหาเลือดออกจำนวนมากทั้งที่เป็นมาแต่กำเนิด และเกิดขึ้นภายหลัง โดยเริ่มจากผู้ป่วย hemophilia A และ B โดยเฉพาะที่มี inhibitor พบว่าผู้ป่วย hemophilia A และ B ไม่สามารถสร้าง thrombin ในปริมาณที่มากพอในการสร้าง fibrin ทำให้ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นไม่แข็งแรง นอกจากนี้ยังขาด thrombin ที่ไปกระตุ้นการสร้าง FXIIIa และ TAFI ทำให้ลิ่มเลือดถูกย่อยสลายโดย fibrinolytic system ง่าย จากการศึกษาพบว่าในภาวะที่ขาด FVIII หรือ FIX การให้ FVIIa ขนาดสูงสามารถกระตุ้นการสร้าง FXa ที่เพียงพอในการสร้าง thrombin ได้²⁷ โดยการทำงานของ rFVIIa บนผิวเซลล์อาศัย TF^{28,29} หรือเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (Activated platelet) โดยไม่ขึ้นกับ TF^{30,31} ในการสร้าง FXa นำไปสู่การสร้าง thrombin ที่เพียงพอในการสร้าง fibrin

ทำให้เกิดลิ่มเลือดที่แข็งแรงขึ้น นอกจากนี้ thrombin ที่เกิดขึ้นยังสามารถเพิ่มปริมาณ FXIIIa และ TAFI ทำให้ลิ่มเลือดสลายช้าลง³² และ thrombin ที่เกิดขึ้นยังกระตุ้นการทำงานของเกร็ดเลือดมากขึ้นด้วย

ปัจจุบันมีหลักฐานทางคลินิกจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ rFVIIa ในการลด และ/หรือป้องกันการเกิดเลือดออก โดยถือเป็นการรักษามาตรฐานในผู้ป่วย hemophilia A และ B ที่มี inhibitor โดยผู้ป่วย hemophilia A และ B ทั้งที่มีและไม่มี inhibitor ที่มีปัญหาเลือดออกในข้อหรือในกล้ามเนื้อตอบสนองต่อการให้ rFVIIa ถึงประมาณร้อยละ 90³³ และ rFVIIa ในขนาด 90 µg/kg สามารถใช้ป้องกันการภาวะเลือดออกจากการผ่าตัดเล็กและการผ่าตัดใหญ่ในผู้ป่วย hemophilia A และ B ที่มี inhibitor ได้ถึงร้อยละ 90-100³⁴ เช่นเดียวกับผู้ป่วย acquired hemophilia³⁵ และสามารถลด หรือป้องกันการภาวะเลือดออกในผู้ป่วยที่ขาด FVII แต่กำเนิดได้³⁶

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ rFVIIa ในภาวะอื่นๆ อีกจำนวนมากในการลดภาวะเลือดออกและการป้องกันการเลือดออกได้แก่ ภาวะเกร็ดเลือดเสียหน้าที่แต่กำเนิด เช่น Glanzmann's thrombasthenia พบว่า rFVIIa สามารถควบคุมเลือดออกและป้องกันการเลือดออกซ้ำในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการให้เกร็ดเลือดได้ เป็นต้น³⁷ สามารถลดเลือดออกในช่วงแรกและลดการให้เกร็ดเลือดในผู้ป่วยเด็กไข้เลือดออก (Dengue hemorrhagic fever)³⁸ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ rFVIIa สามารถลดเลือดออกและลดการให้เลือดในการผ่าตัดต่อมลูกหมากแบบ retropubic prostatectomy³⁹ และลดการให้เลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการบาดเจ็บ blunt trauma⁴⁰ ได้ ส่วนในผู้ป่วยผ่าตัดเปลี่ยนตับมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า rFVIIa สามารถลดปริมาณเลือดออกและการให้เลือดได้⁴¹ แต่ก็มีการศึกษาที่ไม่สนับสนุน⁴²

อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่พบว่า rFVIIa ไม่สามารถลดหรือป้องกันการเลือดออกได้เช่น ในผู้ป่วยตับแข็งที่มีปัญหาเลือดออกในทางเดินอาหารจากการทำ subgroup analysis พบว่า rFVIIa สามารถลดเลือดออกในผู้ป่วยตับแข็ง Child-Pugh class B และ C จาก variceal bleeding ได้⁴³ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาแบบ randomized controlled trial เฉพาะผู้ป่วยตับแข็ง Child-Pugh class B และ C ที่มี variceal bleeding พบว่า rFVIIa ไม่สามารถลดเลือดออกได้⁴⁴ นอกจากนี้ยังพบว่า rVIIa ไม่สามารถลดเลือดออกและการให้เลือดในผู้ป่วยผ่าตัด hepatectomy ทั้งผู้ป่วยตับแข็ง⁴⁵ และไม่เป็นตับแข็ง⁴⁶

นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้ rFVIIa ในลักษณะที่เป็น uni-

versal hemostatic agent ในผู้ป่วยที่มีเลือดออกในสมองพบว่า การศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 2 (Phase II clinical trial) พบว่า rFVIIa สามารถลดการขยายของลิ่มเลือด และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการทำงานของระบบประสาท⁴⁷ แต่การศึกษาต่อมาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นในการศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 3 (Phase III clinical trial) พบว่าการใช้ rFVIIa ลดเฉพาะการขยายของลิ่มเลือดโดยไม่เพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการทำงานของระบบประสาท⁴⁸

การศึกษาต่างๆ พบว่าการใช้ rFVIIa มีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงโดยเฉพาะการเกิดหลอดเลือดอุดตัน (Thromboembolic event) น้อย อย่างไรก็ตามการใช้ rFVIIa เป็น universal hemostatic agent ยังมีความเห็นแตกต่างของผู้เชี่ยวชาญทั้งสนับสนุน⁴⁹ และคัดค้าน⁵⁰

Roles of tissue factor in thrombosis

ปัจจุบันมีหลักฐานจำนวนมากที่แสดงถึงความสำคัญของ TF ต่อการเกิดหลอดเลือดอุดตันทั้งหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง ทั้ง TF ที่อยู่ในบริเวณผนังหลอดเลือด และที่อยู่ในกระแสเลือด โดยอาจพบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocyte ซึ่งถูกกระตุ้นให้เพิ่มการแสดงออกได้โดย lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย^{51,52} บนผิว microparticle ซึ่งส่วนใหญ่มาจากเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้น^{53,54} และบนผิวเกร็ดเลือด⁵⁵ โดยพบว่า TF บนผิวเกร็ดเลือดไม่ได้สร้างมาจากเกร็ดเลือดโดยตรง แต่ถูกถ่ายทอดมาจากบนผิว microparticle ผ่านการทำงานของ P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ของ microparticle ที่จับกับ P-selectin ของเกร็ดเลือด โดย P-selectin ซึ่งอยู่บนผิวของ α -granule ถูกเคลื่อนย้ายออกมาบนผิวเกร็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้น กลไกเหล่านี้ช่วยส่งเสริมการแข็งตัวของเลือดบนผิวเกร็ดเลือดและเพิ่มโอกาสเกิดหลอดเลือดอุดตัน^{56,57} โดยพบว่าผู้ป่วยหลอดเลือดโคโรนารีมีระดับของ TF เพิ่มขึ้นทั้งในกระแสเลือดและใน atherosclerotic plaque^{58,59,60} โดยพบว่าผนังหลอดเลือดแดงที่มี cholesterol สะสมอยู่ จะถูก macrophage ทำหน้าที่เก็บกิน oxidized low density lipoprotein เปลี่ยนเป็น lipid-laden foam cell และจะมีการเพิ่มขึ้นของทั้งปริมาณและการทำงานของ TF บนเซลล์ผนังหลอดเลือด, smooth muscle cell และ macrophage ซึ่งเมื่อ atherosclerotic plaque แตก TF ที่สะสมอยู่มากจะกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดเกิดเป็นลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดแดง^{61,62} และพบว่าการยับยั้ง TF⁶³, FVIIa⁶⁴ และ TF:FVIIa complex^{65,66} สามารถลดการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดแดงได้ ในขณะที่การเกิดหลอดเลือดดำอุดตัน

ดังนั้นไม่พบหลักฐานชัดเจนของการทำลายหลอดเลือดดำ⁶⁷ ดังนั้น TF ที่กระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดน่าจะมาจาก TF ในกระแสเลือดโดยอาศัยการทำงานของ PSGL-1 และ P-selectin เคลื่อนย้าย TF จาก microparticle มาบนผิวเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นส่งเสริมการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดดำ^{56,57,68} โดยพบว่าการยับยั้ง TF⁶⁹ และ P-selectin⁷⁰ สามารถลดการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดดำได้

Roles of tissue factor on pathogenesis of related diseases

ปัจจุบันพบว่ากลไกการแข็งตัวของเลือดมีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดของโรคต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะบทบาทของ TF ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้ง TF:FVIIa และ/หรือ กลไกการแข็งตัวของเลือดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ได้

Sepsis and Inflammation

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า endotoxin หรือ LPS ของ *Escherichia coli* และ *Neisseria meningitidis* กระตุ้นกระบวนการอักเสบ (Inflammatory response) และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ TF ทั้งบนผิวเซลล์ผนังหลอดเลือด และบน monocyte เพิ่มขึ้น เกิดการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดผ่าน TF:FVIIa complex โดยพบว่าระดับการแสดงออกของ TF สัมพันธ์กับความรุนแรงและอัตราการตายในสัตว์ทดลอง^{71,72} และสามารถแสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง TF:FVIIa pathway โดย anti-TF antibody⁷³, TFPI⁷⁴, recombinant nematode anti-coagulant protein (rNAPc2)⁷⁵ และการยับยั้งการทำงานของ FVIIa⁷⁶ สามารถยับยั้งการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดของ LPS และอัตราการตายในสัตว์ทดลองได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาการให้ TFPI ในมนุษย์ไม่พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต⁷⁷

นอกจากนั้นยังพบว่าในภาวะที่มีการอักเสบมีการลดลงของ natural anticoagulant⁷⁸ ทั้ง activated protein C (APC), protein S, antithrombin, และ TFPI ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ทำให้ลดการสลายลิ่มเลือด โดยเฉพาะ APC ซึ่งปัจจุบันพบว่านอกจากมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกลไกการแข็งตัวของเลือดแล้ว ยังมีคุณสมบัติเป็น cytoprotective effect⁷⁹ หลายประการได้แก่ 1) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก 2) มีคุณสมบัติลดการอักเสบ 3) ยับยั้งการตายของเซลล์ (Anti-apoptotic activity) และ 4) รักษาความ

แข็งแรงของเซลล์ผนังหลอดเลือด (Stabilization of endothelial barrier) ซึ่งในปัจจุบัน APC สามารถแสดงให้เห็นประโยชน์ทางคลินิกในการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงพบว่าสามารถลดอัตราการตายที่ 28 วันได้⁸⁰ ซึ่งอาจเป็นผลจากทั้งคุณสมบัติ anticoagulant และ cytoprotective effect ร่วมกัน

Cancer

ปัจจุบันพบว่ามะเร็งมีความสัมพันธ์กับกลไกการแข็งตัวของเลือดโดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งจะมีอุบัติการณ์ของภาวะหลอดเลือดดำอุดตันสูงขึ้นมากกว่าคนทั่วไป โดยมะเร็งที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดดำอุดตันสูงได้แก่ มะเร็งกระดุก มะเร็งสมอง มะเร็งตับอ่อน มะเร็งรังไข่ มะเร็งโลหิต มะเร็งปอด มะเร็งทางเดินอาหาร และมะเร็งตับ สำหรับปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้แก่ มะเร็งระยะแพร่กระจาย การได้รับยาเคมีบำบัด การได้รับฮอร์โมนบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม^{81,82} นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีภาวะหลอดเลือดดำอุดตันเมื่อติดตามต่อไปพบว่าได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งในอัตราที่สูงกว่าคนปกติ โดยพบอัตราเสี่ยงสูงที่สุด 6 เดือนแรกภายหลังการวินิจฉัยภาวะหลอดเลือดดำอุดตัน และร้อยละ 40 ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งมีภาวะมะเร็งแพร่กระจายภายใน 1 ปี⁸²

จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดได้หลายทาง โดยกระบวนการเหล่านี้อาจเกิดจากสารที่เซลล์มะเร็งหลั่งออกมาที่มีผลกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดเช่น mucin ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ P-selectin และ L-selectin กระตุ้นให้เกิดการสร้าง platelet-rich microthrombi ซึ่งเพิ่มพื้นผิวสำหรับกลไกการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสร้าง cysteine proteinase และ TF กระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดมากขึ้น และเมื่อเซลล์มะเร็งเกิดภาวะขาดออกซิเจนจะมีการเพิ่มการทำงานของ MET oncogene เพิ่มการสร้าง PAI-1 ทำให้การสลายลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นลดลง และมีการสร้าง cytokines หลายชนิดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผนังหลอดเลือดที่ส่งเสริมการเกิดการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้เมื่อเซลล์ของร่างกายเช่น macrophage ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งจะมีการหลั่งสารเช่น tumor necrosis factor, interleukin-1 และ interleukin-6 เป็นต้น ทำให้เกิดการทำลายของผนังหลอดเลือด กระตุ้นการทำงานของกลไกการแข็งตัวของเลือด การที่ผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัดอาจทำให้เกิดการทำลายของผนังหลอดเลือดมากขึ้นกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือดมากขึ้น⁸³ ซึ่งมีการศึกษา

พบว่า low molecular weight heparin สามารถลดการกลับเป็นซ้ำของภาวะหลอดเลือดดำอุดตันในผู้ป่วยมะเร็งได้ดีกว่า warfarin⁸⁴ ซึ่งอาจเป็นผลจาก heparin ไปยับยั้งการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดของเซลล์มะเร็งได้หลายทางมากกว่า warfarin นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดในผู้ป่วยมะเร็งที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย^{85,86} ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ heparin มีคุณสมบัติต่อต้านเซลล์มะเร็งเนื่องจากยับยั้งการทำงานของ thrombin ซึ่งทั้ง thrombin และ fibrin เป็นสารที่เซลล์มะเร็งใช้ในการเจริญเติบโต และยังมีคุณสมบัติต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วย⁸⁷

นอกจากนี้ยังพบว่ากลไกการแข็งตัวของเลือดโดยเฉพาะ TF ส่งเสริมการเติบโตของเซลล์มะเร็ง การแพร่กระจาย และการสร้างระบบหลอดเลือด โดยพบว่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีการแสดงออกของ TF ที่ผิวเซลล์เพิ่มขึ้นเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น โดยพบว่าปริมาณการแสดงออกของ TF สัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็ง^{88,89,90}

จากการศึกษาต่างๆ พบว่าบทบาทของ TF ต่อการเกิดมะเร็งนั้นอาจผ่านกลไกการแข็งตัวของเลือด หรืออาจผ่านกลไกอื่นๆ โดยพบว่า TF ส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดให้เกิด thrombin โดย thrombin ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้น G protein-coupled protease activated receptors 1 (PAR1)⁹¹ บนผิวเซลล์มะเร็งกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจาย นอกจากนี้ thrombin ยังกระตุ้นการทำงานของเกร็ดเลือดซึ่งส่งเสริมการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งโดยยับยั้ง natural killer cell, หลั่งสารกระตุ้นการสร้างหลอดเลือด (Proangiogenic substance) และสารกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง จาก granule ของเกร็ดเลือด⁹² นอกจากนี้ยังพบว่า cytoplasmic domain ของ TF สามารถส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้โดยตรงผ่านทาง การส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ (Intracellular signal transduction)⁹³ นอกจากส่งเสริมการแพร่กระจายแล้ว TF ยังส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (Angiogenesis) โดยพบว่า TF เพิ่มการสร้าง angiogenic growth factor ที่สำคัญคือ vascular endothelial growth factor (VEGF) และลดการสร้าง anti-angiogenic factor ที่สำคัญคือ thrombospondin⁹⁴ และยังมีการศึกษาพบว่า cytoplasmic domain ของ TF มีส่วนสำคัญต่อกระบวนการสร้างหลอดเลือด โดยภาวะปกติ cytoplasmic domain ของ TF อยู่ในรูปที่ไม่มี phosphorylation แต่ในเซลล์มะเร็งพบว่า cytoplasmic domain อยู่ในรูป phosphorylation

ผ่านการทำงานของ protein kinase C- α (PKC- α) โดยผ่าน PAR2⁹⁵ ดังนั้น TF จึงเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคมะเร็งโดยพบว่าการยับยั้ง TF:FVIIa ในสัตว์ทดลองสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งได้⁹⁶

Antiphospholipid syndrome

Antiphospholipid syndrome (APS) เป็นกลุ่มอาการที่มีภาวะหลอดเลือดอุดตันเนื่องจากมี autoantibody ต่อ phospholipid binding protein ที่สามารถจับกับ anionic phospholipid เช่น β_2 -glycoprotein-I (β_2 -GPI) และ prothrombin เป็นต้น⁹⁷ โดยสามารถเกิดได้ทั้งในหลอดเลือดดำซึ่งพบบ่อยที่สุด หลอดเลือดแดง หลอดเลือดฝอย หรือหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงรก ซึ่งทำให้เกิดการแท้ง ตายคลอด หรือ คลอดก่อนกำหนด โดย anti- β_2 -GPI อาจทำให้เกิดการแข็งตัวของลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดผ่านหลายกลไก ได้แก่ 1) กระตุ้นเกร็ดเลือด เซลล์ผนังหลอดเลือด และเม็ดเลือดขาวเพิ่มการแสดงออกของ procoagulant, proinflammatory cytokines และ TF 2) ยับยั้งการทำงานของ natural anticoagulant เช่น APC และ annexin A5 และ 3) การกระตุ้นระบบ complement

จากการศึกษาพบว่า TF มีบทบาทสำคัญในการเกิดหลอดเลือดอุดตัน และการสูญเสียทารกในครรภ์ในผู้ป่วย APS โดยพบว่า TF มีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วย APS และมีความสัมพันธ์กับปริมาณ antibody และความถี่ของการเกิดหลอดเลือดอุดตันในผู้ป่วย APS⁹⁸ ซึ่งพบว่า TF ในผู้ป่วย APS เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นของ anti- β_2 -GPI จับกับ receptor บนผิวเซลล์ผนังหลอดเลือดและ monocyte ส่งสัญญาณกระตุ้นการสร้าง transcription factors เช่น early growth response-1 (Egr-1) protein และ nuclear factor- κ B (NF- κ B) เป็นต้น^{99,100} นอกจากนี้พบว่า anti- β_2 -GPI กระตุ้นระบบ complement ผ่าน C5a receptor บนผิว neutrophil ทำให้เพิ่มการแสดงออกของ TF บนผิว neutrophil ทำให้เกิดการทำลายของ trophoblast และการตายของตัวอ่อนจากการกระตุ้นกลไกการอักเสบของ TF มากกว่าการทำให้เกิดหลอดเลือดที่อุดตัน¹⁰¹

สรุป

กลไกการแข็งตัวของเลือดบนผิวเซลล์ (Cell based model of coagulation) นอกจากจะทำให้เกิดความเข้าใจที่มีความสำคัญ และสามารถอธิบายกลไกการแข็งตัวของเลือดมากยิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับ waterfall hypothesis ยังนำไปสู่การศึกษาบทบาทของ TF

และ FVIIa ทั้งในกระบวนการห้ามเลือด และ ภาวะหลอดเลือดอุดตัน และพยาธิกำเนิดของโรคอื่นๆ อีกมากมาย อีกทั้งยังทำให้เกิดการศึกษาวិธีการรักษาและยาใหม่ที่น่าสนใจไปสู่การพัฒนาการรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ โดยเฉพาะ rFVIIa ที่ถือเป็นการพลิกโฉมการดูแลรักษาผู้ป่วย hemophilia ที่มี inhibitor และผู้ป่วยอื่นๆ ที่มีภาวะเลือดออกรุนแรง ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยที่พยายามคิดค้นยาใหม่ๆ ที่ออกฤทธิ์ต่อ TF:FVIIa pathway ทั้งในการรักษาผู้ป่วยที่มีเลือดออก และภาวะหลอดเลือดอุดตันและโรคอื่นๆ ที่ TF/FVIIa pathway มีบทบาทสำคัญในพยาธิกำเนิดอันจะนำไปสู่การพัฒนาการดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310-2.
2. Hoffman M, Monroe DM. A cell based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65.
3. Fleck RA, Rao LVM, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 1990;57:765-81.
4. Flossel C, Luther T, Muller M, Albrecht S, Kasper M. Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. *Histochemistry* 1994;101:449-53.
5. Hoffman M, Colina CM, McDonald AG, et al. Tissue factor around dermal vessels has bound factor VII in the absence of injury. *J Thromb Haemost* 2007;5:1403-8.
6. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000;96:170-5.
7. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:456-61.
8. Bom VJ, Bertina RM. The contributions of Ca^{2+} , phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J* 1990; 265:327-36.
9. Østerud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 5260-4.
10. Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol* 1994;88:364-71.
11. Pieters J, Lindhout T, Hemker HC. In situ-generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor VIII and factor V in thromboplastin-activated plasma. *Blood* 1989;74: 1021-4.

12. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood* 2000;95:1694-702.
13. Rosing J, van Rijn JL, Bevers EM, van Dieijen G, Comfurius P, Zwaal RF. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation *Blood* 1985; 65:319-32.
14. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994;269:23357-66.
15. Warn-Cramer BJ, Maki SL, Zivelin A, Rapaport SI. Partial purification and characterization of extrinsic pathway inhibitor (the factor Xa-dependent plasma inhibitor of factor VIIa/tissue factor). *Thromb Res* 1987;48:11-22.
16. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988;71:335-43.
17. Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, et al. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VII on endothelium. *J Biol Chem* 2007;282:11849-57.
18. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:170-7.
19. Shen L, Lorand L. Contribution of fibrin stabilization to clot strength. Supplementation of factor XIII-deficient plasma with the purified zymogen. *J Clin Invest* 1983;71:1336-41.
20. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603-8.
21. Hedner U. Mechanism of action, development and clinical experience of recombinant FVIIa. *J Biotechnol* 2006;124: 747-57.
22. Leiba H, Ramot B, Many A. Heredity and coagulation studies in ten families with factor XI (plasma thromboplastin antecedent). *Br J Haematol* 1965;11:654-65.
23. Tuddenham EGD, Pemberton S, Cooper DN. Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost* 1995;74:313-21.
24. Bugge TH, Xiao Q, Kombrink KW, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6258-63.
25. Cameliot P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996;383: 73-5.
26. Rosen ED, Chan JCY, Idusogie E, et al. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 1997;390:290-4.
27. Allen GA., Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. The effect of factor X level on thrombin generation and the procoagulant effect of activated factor VII in a cell-based model of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11(Suppl. 1): S3-S7.
28. Van't Veer C, Golden NJ, Mann KG. Inhibition of thrombin generation by the zymogen factor VII: implications for the treatment of hemophilia A by factor VIIa. *Blood* 2000;95:1330-5.
29. Butenas S, Brummel KE, Branda RF, Paradis SG, Mann KG. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002;99:923-30.
30. Monroe DM, Hoffman M, Olivier JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol* 1997;99:642-7.
31. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Platelet-dependent action of high-dose factor VIIa. *Blood* 2002;100:364-5.
32. Lisman T, Mosnier LO, Lambert T, et al. Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe haemophilia A. *Blood* 2002;99:175-9.
33. Lusher JM, Roberts HR, Davignon G, et al. A randomized, double-blind comparison of two dosage levels of recombinant factor VIIa in the treatment of joint, muscle and mucocutaneous haemorrhages in persons with haemophilia A and B, with and without inhibitors. rFVIIa Study Group. *Haemophilia* 1998;4:790-8.
34. Shapiro AD, Gilchrist GS, Hoots WK, Cooper HA, Gastineau DA. Prospective, randomised trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery *Thromb Haemost* 1998;80:773-8.
35. Lusher JM. Recombinant Factor VIIa (NovoSeven) in the treatment of internal bleeding in patients with factor VIII and IX inhibitors. *Haemostasis* 1996;26(suppl 1):124-30.
36. Brenner B, Wiis J. Experience with recombinant-activated factor VII in 30 patients with congenital factor VII deficiency. *Hematology* 2007;12:55-62.
37. Poon MC, d'Oiron R, von Depka M, et al. Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost* 2004;2:1096-103.
38. Chuansumrit A, Wangruangsattid S, Lektrakul Y, et al. Control of bleeding in children with Dengue hemorrhagic fever using recombinant activated factor VII: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16: 549-55.
39. Friederich PW, Henny CP, Messelink EJ, et al. Effect of recombinant activated factor VII on perioperative blood loss in patients undergoing retropubic prostatectomy: a double-blind placebo-controlled randomised trial. *Lancet* 2003;361:201-5.

40. Boffard KD, Riou B, Warren B, et al. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Trauma* 2005;59:8-15.
41. Lodge JP, Jonas S, Jones RM, et al. Efficacy and safety of repeated perioperative doses of recombinant factor VIIa in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:973-9.
42. Planinsic RM, van der Meer J, Testa G, et al. Safety and efficacy of a single bolus administration of recombinant factor VIIa in liver transplantation due to chronic liver disease. *Liver Transpl* 2005;11:895-900.
43. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, et al. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology* 2004;127:1123-30.
44. Bosch J, Thabut D, Albillos A, et al. Recombinant factor VIIa for variceal bleeding in patients with advanced cirrhosis: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008;47:1604-14.
45. Shao YF, Yang JM, Chau GY, et al. Safety and hemostatic effect of recombinant activated factor VII in cirrhotic patients undergoing partial hepatectomy: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Surg* 2006;191:245-9.
46. Lodge JP, Jonas S, Oussoultzoglou E, et al. Recombinant coagulation factor VIIa in major liver resection: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Anesthesiology* 2005;102:269-75.
47. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, et al. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2005;352:777-85.
48. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, et al. Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2008;358:2127-37.
49. Roberts HR. Recombinant factor VIIa: a general hemostatic agent? Yes. *J Thromb Haemost* 2004;2:1691-4.
50. Levi M. Recombinant factor VIIa: a general hemostatic agent? Not yet. *J Thromb Haemost* 2004;2:1695-7.
51. Lerner RG, Goldstein R, Cummings G, Lange K. Stimulation of human leukocyte thromboplastin activity by endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;138:145-8.
52. Gregory SA, Morrissey JH, Edgington TS. Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Mol Cell Biol* 1989;9:2752-5.
53. Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994;153:3245-55.
54. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841-3.
55. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002;13:247-53.
56. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000;96:170-5.
57. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon micro-particle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003;197:1585-98.
58. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998;81:22-6.
59. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;99:2908-13.
60. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996;94:3090-7.
61. Kato K, Elsayed YA, Namoto M, Nakagawa K, Sueishi K. Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res* 1996;82:335-47.
62. Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, et al. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation* 1996;94:1226-32.
63. Roque M, Reis ED, Fuster V, et al. Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2303-10.
64. Arnljots B, Ezban M, Hedner U. Prevention of experimental arterial thrombosis by topical administration of active site-inactivated factor VIIa. *J Vasc Surg* 1997;25:341-6.
65. Suleymanov OD, Szalony JA, Salyers AK, et al. Pharmacological interruption of acute thrombus formation with minimal hemorrhagic complications by a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor: comparison to factor Xa and thrombin inhibition in a nonhuman primate thrombosis model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:1115-21.
66. Moons AH, Peters RJ, Bijsterveld NR, et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex, in patients undergoing elective coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2147-53.
67. Sevitt S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 1974;27:517-28.
68. Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost*

- 2004;92:459-66.
69. Himber J, Wohlgensinger C, Roux S, et al. Inhibition of tissue factor limits the growth of venous thrombus in the rabbit. *J Thromb Haemost* 2003;1:889-95.
 70. Myers DD Jr, Rectenwald JE, Bedard PW, et al. Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P-selectin. *J Vasc Surg* 2005;42:329-36.
 71. Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB, Jr. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol* 1993;142:1458-70.
 72. Østerud B, Flægstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost* 1983;49:5-7.
 73. Taylor FB, Jr, Chang A, Ruf W, et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991;33:127-34.
 74. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB, Jr, Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest* 1993;91:2850-6.
 75. Moons AH, Peters RJ, Cate Ht H, et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, a novel inhibitor of tissue factor-factor VIIa activity, abrogates endotoxin-induced coagulation in chimpanzees. *Thromb Haemost* 2002;88:627-31.
 76. Taylor FB, Chang AC, Peer G, Li A, Ezban M, Hedner U. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli*. *Blood* 1998;91:1609-15.
 77. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:238-47.
 78. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation: compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 1992;101:816-23.
 79. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109:3161-72.
 80. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
 81. Baron JA, Gridley G, Weiderpass E, Nyren G, Linet M. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* 1998;351:1077-80.
 82. Sorensen ST, Mellemkjaer L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen JL. The risk of diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1998;338:1169-73.
 83. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007;110:1723-9.
 84. Lee AY, Levine MN, Baker RI, et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* 2003;349:146-53.
 85. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* 2004;22:1944-8.
 86. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 2005;23:2130-5.
 87. Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, et al. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;61:195-207.
 88. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996;56:5063-70.
 89. Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998;79:19-22.
 90. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000;31:443-7.
 91. Fischer EG, Riewald M, Huang HY, et al. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J Clin Invest* 1999;104:1213-21.
 92. Gupta GP, Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* 2004;114:1691-3.
 93. Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH. Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 1999;82:88-92.
 94. Zhang Y, Deng Y, Luther T, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994;94:1320-7.
 95. Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2004;279:23038-44.
 96. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 2003;63:2997-3000.
 97. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krillis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007;109:422-30.

98. Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, et al. Tissue factor expression on monocytes induced by anti-phospholipid antibodies as a strong risk factor for thromboembolic complications in SLE patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:195-200.
99. Kinev AV, Romay-Penabad Z, Liu X, Pierangeli SS, Roubey RAS. The transcription factor Egr-1 plays a critical role in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl. 2):O-S-012 [abstract].
100. Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 2004;16:1633-41.
101. Redecha P, Tilley R, Tencati M, et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 2007;110:2423-31.

